

Evaluasi Keragaman Genetik Mutan Harapan Generasi MV1 Jeruk Keprok SoE (*Citrus reticulata* Blanco) Berdasarkan Penanda Morfologi dan ISSR

(Evaluation of Genetic Diversity of Putative Mutant MV1 Generation of Mandarin SoE (*Citrus reticulata* Blanco) Based on Morphology and ISSR Markers)

Indriati Husain¹, Agus Purwito^{2*}, Ali Husni³, Kikin H. Mutaqin⁴, dan Slamet Susanto²

Diterima 21 Maret 2016/Disetujui 06 Juli 2016

ABSTRACT

Mandarin's SoE is national variety originated from Mount of Mutis, Sub District of SoE, of Timur Tengah Selatan (TTS) District, East Nusa Tenggara (NTT). The genetic diversity of citrus can be induced by gamma ray irradiation on embryogenic callus cells thus producing new mutants. Genetic diversity detection can be based on morphological and ISSR markers. The aim of this research was to obtain information on the genetic diversity on putative mutants mandarin SoE induced by gamma ray irradiation based on morphology and markers ISSR. ISSR markers used are ISSR 1, 4, 6 and 8. Analysis of morphological diversity produced a dendrogram with the level of similarity between individuals each irradiation dose 83-95% with 5-17% genetic distance. Dendrogram analysis based on the genetic diversity ISSR markers showed high levels of 51-100% similarity and genetic distance 0-49%. Individual sample obtained from gamma irradiation, based both morphological and ISSR markers, was different from individual's genetic make up before irradiation.

Keywords: cluster, gamma ray, genetic distance, genetic diversitis, similarity

ABSTRAK

Jeruk keprok SoE adalah jeruk varietas unggul nasional yang berasal dari Pegunungan Mutis, Kecamatan SoE, Kabupaten Timur Tengah Selatan (TTS), Provinsi Nusa Tenggara Timur (NTT). Keragaman genetik jeruk ini dapat diinduksi dengan iradiasi sinar gamma pada sel-sel kalus embriogenik untuk menghasilkan mutan yang solid. Deteksi keragaman genetik yang terbentuk dapat dilakukan secara morfologi maupun molekuler dengan marka ISSR. Tujuan Penelitian ini adalah untuk mendapatkan informasi mengenai keragaman genetik yang terjadi pada mutan harapan jeruk keprok SoE hasil iradiasi sinar gamma berdasarkan morfologi dan marka ISSR. Marka ISSR yang digunakan adalah ISSR 1, 4, 6 dan 8 pada beberapa mutan harapan jeruk keprok SoE. Analisis keragaman secara morfologi menghasilkan dendrogram dengan tingkat kemiripan antar individu masing-masing dosis iradiasi 83-95% dengan jarak genetik 5-17%. Dendrogram analisis keragaman genetik berdasar marka ISSR memperlihatkan tingkat kemiripan 51-100% dan jarak genetik 0-49%. Individu-individu sampel yang diuji hasil iradiasi gamma, baik secara morfologi dan marka ISSR, telah memiliki susunan genetik yang berbeda dari susunan genetik individu sebelum diiradiasi.

Kata kunci: grup, jarak genetik, kemiripan, keragaman, sinar gamma

PENDAHULUAN

Jeruk keprok SoE adalah jeruk unggul nasional yang berasal dari Pegunungan Mutis,

Kecamatan SoE, Kabupaten Timur Tengah Selatan (TTS), Provinsi Nusa Tenggara Timur (NTT). Jeruk ini telah dilepas sebagai varietas unggul dengan SK Menteri Pertanian

¹Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Negeri Gorontalo, Jl. Jend. Sudirman No.6, Kota Gorontalo, Gorontalo, 96128, Indonesia

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University) Jl. Meranti, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia. Telp/ Faks. 62-251-8629353

³Balai Besar Bioteknologi dan Sumberdaya Genetika Pertanian, Jl. Tentara Pelajar No.3A, Bogor 16111, Indonesia

⁴Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University)

Jl. Kamper, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

email: apurwito@yahoo.com (*penulis korespondensi)

No.863/Kpts/TP.240/11/98. Jeruk ini memiliki rasa manis bercampur rasa asam yang segar, dan kulitnya mudah dikupas. Ciri khas lain dari jeruk ini adalah kulit buah yang sudah matang berwarna oranye kemerah-merahan.

Jeruk memiliki sistem reproduksi yang unik, yaitu secara apomiksis yaitu suatu bentuk reproduksi melalui biji yang mana embrio terbentuk bukan dari hasil peleburan sel telur dan sel spermatozoid tapi dapat terjadi karena: proses parthenogenesis dari sel telur yang tidak dibuahi, apogami dari sel-sel antipoda dan sinergid, ataupun dari embrio adventif seperti embrio nuselar (Kepiro dan Roose, 2007; Koltunow *et al.*, 1995). Tanaman jeruk yang diperoleh melalui reproduksi secara apomiksis ini memiliki sifat yang sama dengan induk tanamannya (*true-to-type*) (Khan *et al.*, 2007; Setiono dan Supriyanto, 2005). (Koltunow *et al.*, 1995). Perbanyak tanaman jeruk melalui reproduksi aseksual ini dapat dimanfaatkan untuk perbanyak tanaman jeruk yang memiliki sifat-sifat unggul atau sifat khas jeruk dari suatu daerah atau sentra tanaman jeruk di wilayah-wilayah tertentu.

Kegiatan yang dilakukan dengan tujuan mendapatkan tanaman jeruk yang unggul atau khas suatu daerah dengan penambahan sifat-sifat lain seperti tahan terhadap cekaman biotik ataupun abiotik dapat dilakukan dengan memanfaatkan metode-metode dalam kegiatan pemuliaan tanaman. Metode-metode dalam kegiatan pemuliaan tanaman dimaksudkan mendapatkan atau mengembangkan varietas-varietas baru dari suatu tanaman sehingga menjadi lebih baik dan menguntungkan bagi kehidupan manusia. Ruang lingkup kegiatan pemuliaan tanaman meliputi pembentukan keragaman genetik dan seleksi. Keragaman genetik yang terbentuk dapat dimanfaatkan sebagai bahan atau populasi dasar untuk proses pemuliaan tanaman. Seleksi adalah kegiatan dengan melakukan pengujian-pengujian individu-individu yang kualitasnya unggul sebelum varietas baru dilepas (Pardal, 2014; Sastrosumarjo *et al.*, 2006). Evaluasi keragaman terhadap tiga varietas jeruk keprok dilakukan dengan melihat perubahan warna kulit dari kombinasi perlakuan *Degreening* dan suhu penyimpanan (Muthmainnah *et al.*, 2014).

Peningkatan keragaman genetik tanaman dapat dilakukan melalui beberapa cara, seperti, introduksi, hibridisasi, seleksi,

bioteknologi dan mutasi (IAEA, 1991; Pardal, 2014; Sastrosumarjo *et al.*, 2006). Keragaman genetik pada tanaman jeruk keprok SoE dapat ditingkatkan dengan cara mutasi, mutasi buatan atau mutasi induksi. Mutasi adalah perubahan-perubahan yang terjadi pada susunan gen/genom tanaman. Mutagen yang paling sering digunakan adalah sinar gamma. Sinar gamma memiliki daya tembus yang lebih tinggi sehingga peluang terjadinya mutasi akan lebih besar pula. Iradiasi gamma dipaparkan pada kalus embriogenik jeruk keprok SoE yang terdiri atas individu-individu sel yang jumlahnya sangat banyak. Kalus embriogenik kemudian diregenerasikan hingga membentuk planlet. Individu-individu planlet yang berasal dari proses regenerasi individu-individu sel tersebut merupakan mutan yang solid, tidak menghasilkan mutan kimera, karena berasal dari satu sel tunggal (Mba *et al.*, 2009).

Evaluasi keragaman genetik dari mutan harapan hasil iradiasi sinar gamma jeruk keprok SoE diperlukan untuk melihat ada tidaknya perubahan genetik yang terjadi pada susunan gennya. Deteksi adanya perubahan dalam susunan gen menggunakan marka molekuler ISSR yang berbasis PCR. Marka ISSR lebih sesuai digunakan untuk tanaman jeruk, karena tidak dipengaruhi oleh musim dan lingkungan (Azrai, 2005), tidak diperlukan data sekuen awal (Guo *et al.*, 2009), hanya membutuhkan 5-50 mg *template* DNA per reaksi (Sanjay *et al.*, 2011), tersebar di seluruh genom, menghasilkan pita polimorfik sampai pada tingkat kultivar, bersifat dominan (Kumar, 2009), dapat digunakan untuk analisis keragaman genetik dan analisis kekerabatan (Yulianti *et al.*, 2010). Dengan demikian, diharapkan dari proses iradiasi gamma pada kalus embriogenik jeruk keprok SoE bisa diperoleh individu-individu tanaman yang berbeda dalam susunan genetiknya.

Marka ISSR telah digunakan dalam penelitian untuk mengetahui kekerabatan jeruk siam dari beberapa sentra produksi di Indonesia (Agisimanto *et al.*, 2007), dan variasi genetik jeruk keprok SoE hasil iradiasi sinar gamma generasi kedua (Yulianti *et al.*, 2010). Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan informasi mengenai keragaman genetik yang terjadi pada mutan harapan jeruk keprok SoE hasil iradiasi sinar gamma berdasarkan morfologi dan marka ISSR.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan dalam analisis keragaman berdasarkan morfologi adalah individu-individu sampel uji kontrol (R0) dan individu-individu mutan harapan generasi pertama MV1 (R65, R75 dan R85) dari masing-masing perlakuan dosis sinar gamma 65, 75 dan 85 Gy yang diambil secara acak, masing-masing sebanyak lima individu sampel berupa planlet berumur 10 bulan. Planlet jeruk keprok SoE yang digunakan berasal dari kalus embriogenik hasil regenerasi melalui proses embriogenesis somatik tidak langsung (*indirect somatic embryogenesis*).

Bahan tanaman yang digunakan untuk analisis keragaman genetik berdasar marka ISSR adalah daun dari lima belas individu sampel uji yang terdiri atas lima sampel kontrol dan sepuluh sampel mutan harapan generasi pertama MV1 yang diambil secara acak dan mewakili setiap dosis sinar gamma (65, 75 dan 85 Gy) berumur 8 bulan setelah aklimatisasi.

Buffer-buffer isolasi DNA [Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 2%, Kloroform-isoamilalkohol (CIA), propan-2-ol (isopropanol), etanol 70%], agarose Invitrogen, TAE 1x, TAE 2x, loading dye, GelRed, dan Primer ISSR seperti yang tercantum dalam Tabel 1.

Iradiasi Sinar Gamma terhadap Kalus Embriogenik Jeruk Keprok SoE

Induksi mutasi dengan sinar gamma diterapkan pada kalus embriogenik jeruk keprok SoE dengan dosis 75 Gy dan dua dosis tambahan 65 dan 85 Gy. Dosis 75 Gy dipakai berdasarkan dosis iradiasi gamma LD_{50} (75.31 Gray) dari hasil penelitian Karyanti (2013); Karyanti *et al.* (2015) sebelumnya. Kalus

embriogenik kemudian diregenerasikan melalui proses embriogenesis somatik membentuk planlet lengkap dengan daun dan akar.

Analisis Keragaman Genetik Berdasarkan Morfologi

Pengamatan sifat morfologi dilakukan terhadap karakter-karakter kualitatif seperti bentuk batang, warna batang, bentuk daun, warna daun, bentuk tepi daun, ketegakan tunas, dan bentuk stomata. Individu-individu sampel yang diamati diambil secara acak berupa individu-individu planlet kontrol R0 sebanyak lima individu planlet dan mutan harapan generasi MV1 (hasil iradiasi gamma 65, 75 dan 85 Gy) masing-masing lima individu planlet.

Skoring penanda morfologi dilakukan terhadap beberapa karakter morfologi yang pengamatannya diasumsikan setara dengan jenis primer pada penanda molekuler. Sub karakter setara dengan lokus pita pada penanda molekuler. Data karakter morfologi tersebut diubah menjadi data biner dengan skoring 1 atau 0. Apabila karakter morfologi tidak dimiliki oleh planlet maka diberi nilai skor 0, sedangkan apabila planlet memiliki karakter yang diamati maka diberikan nilai skor 1. Analisis stomata menggunakan metode analisis stomata sediaan preparat segar menurut Mulyono (2011).

Analisis Keragaman Genetik Berdasarkan Penanda Molekuler

Kegiatan dalam analisis keragaman genetik berdasarkan penanda molekuler dilakukan berturut-turut proses isolasi DNA, amplifikasi DNA *template* dengan teknik PCR, pemisahan pita-pita DNA dengan metode elektroforesis dan visualisasi gel hasil elektroforesis dan dokumentasi.

Tabel 1. Nama primer, sekuen, ukuran sekuen dan suhu penempelan primer untuk jenis primer ISSR.

Nama Primer	Sekuen	Suhu Annealing ($^{\circ}$ C)
ISSR 1	5'AACACACACACACACA-3'	53
ISSR 4	5'TAATCCTCCTCCTCCTCC-3'	53
ISSR 6	5'CGTTCCTCCTCCTCCTCC-3'	53
ISSR 8	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTC-3'	53

Sumber: Karyanti (2013)

Isolasi DNA total tanaman menggunakan Metode CTAB yang dimodifikasi (Ardiana, 2009) dengan penambahan β -Mercaptoetanol 0.2%. Daun sampel tanaman ditimbang sebanyak 1.0-10 mg. Sampel digerus sampai halus bersama buffer CTAB 1000 μ L menggunakan mortar dan pistil. Setelah halus, suspensi sampel dimasukkan dalam tabung mikro ukuran 2 mL dan diinkubasi dalam waterbath dengan suhu 65 °C selama 1 jam, bolak-balik tabung mikro setiap 10 menit. Suspensi kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit dan ditambahkan Kloroform-Isoamilalkohol (CIA) (24:1) sebanyak 800 μ L. Suspensi disentrifuse pada suhu 4 °C, kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Lapisan epifase (supernatan) bagian atas campuran yang telah berpisah, diambil sebanyak 700 μ L dan dipindahkan ke tabung mikro ukuran 1.5 mL yang baru. Propan-2-ol (isopropanol) ditambahkan sebanyak satu kali volume epifase yang diambil tadi dan dibolak-balik perlahan selama 10 menit. Suspensi diinkubasi dalam lemari es suhu -20 °C selama 10-20 menit dan disentrifuse pada suhu 4 °C, kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Setelah suspensi disentrifuse, buang supernatan dan pelet DNA berada pada dasar tabung mikro. Pelet DNA dicuci dengan menambahkan etanol 70% sebanyak 200 μ L, lalu disentrifuse pada suhu 4 °C, kecepatan 12000 rpm selama 5 menit dan supernatan dibuang. Pelet kemudian dikeringanginkan selama 1 jam pada suhu ruangan dengan memiringkan tabung mikro di atas lembaran tisu. Pelet yang telah kering disuspensi dengan TE 1x sebanyak 100 μ L dan disimpan pada suhu -20 °C. DNA total yang telah diperoleh dari proses ekstraksi dan isolasi DNA dilakukan pengujian terhadap kualitas maupun kuantitas DNA dengan menggunakan Teknik Nanodrop.

Amplifikasi DNA menggunakan mesin Thermal Cycler AB9600. Campuran PCR setengah reaksi total 12.5 μ L terdiri dari 6.25 μ L PCR ready mix Kappa BioSystems, 2.25 μ L ddH₂O, 2 μ L primer ISSR dan 2 μ L DNA template. Kondisi PCR untuk sampel-sampel dengan primer ISSR, proses amplifikasi terdiri atas: satu siklus denaturasi 95 °C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 40 siklus yang terdiri atas proses denaturasi 95 °C, 15 detik, annealing 53 °C, 15 detik, dan elongasi 72 °C, 2 detik, dan satu siklus pemanjangan akhir 72 °C

selama 10 menit dan pendinginan pada suhu 4 °C selama 5 menit.

Sampel-sampel hasil PCR hasil amplifikasi dengan primer ISSR, masing-masing dilakukan pemisahan pita-pita DNA dengan Metode Elektroforesis pada gel agarose konsentrasi 1.5% yang telah dicampur dengan GelRed untuk pewarnaan DNA dengan kekuatan arus listrik 75 Volt selama 30 menit. Setelah itu, gel hasil elektroforesis diletakkan di atas UV transiluminator dan difoto untuk dokumentasi dengan kamera digital.

Pengamatan pada deteksi molekuler dengan marka ISSR dilakukan terhadap pola pita hasil elektroforesis. Skoring pita DNA dilakukan berdasarkan keberadaan pita DNA pada setiap sampel tanaman. Pita-pita DNA yang terbentuk dari hasil analisis marka molekuler dianggap sebagai satu karakter yang mewakili satu lokus DNA. Pengamatan ditujukan pada pola pita dengan jarak migrasi yang sama. Pita-pita DNA dengan laju migrasi yang sama diasumsikan sebagai lokus yang homolog. Apabila pada jarak migrasi yang sama tidak terdapat pita, maka diberikan nilai skor 0. Sebaliknya, apabila pada jarak migrasi tersebut terdapat pita, maka diberikan nilai skor 1.

Analisis Data Morfologi dan Penanda Molekuler

Analisis data morfologi dan penanda molekuler ISSR untuk melihat tingkat (koefisien) kemiripan, pengelompokkan dan penyajian dalam bentuk dendrogram digunakan program NTSys. Jarak genetik dihitung berdasarkan rumus Koefisien Dice (Bustaman dan Mahrup, 2003). Rumus koefisien Dice untuk menghitung jarak genetik: $D = 1 - S.S$: Similarity (kemiripan).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Evaluasi Keragaman Genetik Berdasar Morfologi pada Mutan Harapan Generasi MV1 Jeruk Keprok SoE

Berdasarkan dendrogram (Gambar 2) yang diolah dari hasil skoring karakter kualitatif sifat morfologi individu-individu planlet jeruk keprok SoE kontrol dan mutan harapan MV1 (Tabel 2) memperlihatkan bahwa karakter kualitatif dari individu kontrol

R0 (tanpa iradiasi gamma) sekelompok dengan individu mutan harapan R65. Individu mutan harapan R75 dan R85 masing-masing mengelompok sendiri. Koefisien (tingkat) kemiripan antara individu-individu kontrol R0 dan mutan harapan MV1 tersebut adalah 83-95%, dengan jarak genetik 0-17%. Individu-individu R75 telah berbeda susunan genetiknya dari individu-individu kontrol R0 dan mutan harapan R65, demikian pula dengan individu-individu mutan harapan R85. Penelitian Karyanti *et al.* (2015) melaporkan bahwa pada jeruk keprok Garut menghasilkan keragaman 0-58% pada sifat-sifat kualitatif menggunakan penanda morfologi dengan kisaran dosis iradiasi gamma 0-100 Gray.

Tabel 2 memperlihatkan karakter kualitatif yang dapat diamati dalam sifat morfologi individu planlet mutan harapan jeruk keprok SoE adalah bentuk batang (pada perolehan pencahayaan yang sama), warna batang, bentuk daun, warna daun, bentuk tepi daun, pertegakkan tunas, dan bentuk stomata.

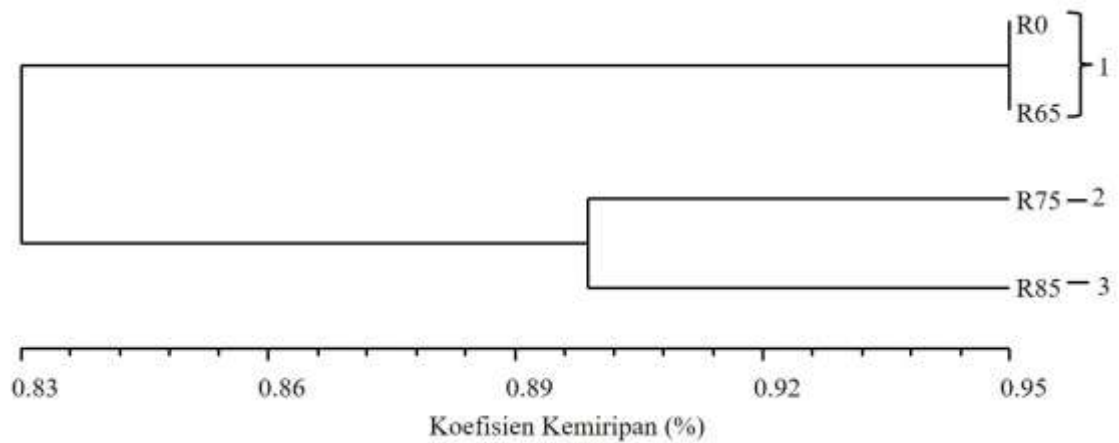
Bentuk batang individu-individu kontrol R0 dan mutan harapan R65, R75 dan R85 yang dapat diamati adalah lurus dan melengkung. Bentuk batang yang melengkung bukan karena pengaruh kurang atau tidak adanya cahaya, karena kuantitas cahaya yang diperoleh adalah sama. Perbedaan bentuk batang di antara individu-individu tersebut

adalah pada persentase jumlah batang lurus dan melengkung. Individu-individu R0 lebih banyak didapati bentuk batang yang melengkung sebesar 80%, individu mutan harapan R65 lebih banyak bentuk batang lurus (80%). Individu mutan harapan R75 lebih banyak bentuk batang melengkung (60%), perbandingan jumlah antara bentuk batang lurus dan melengkung mendekati 50:50. Individu mutan harapan R85 memiliki bentuk batang sama dengan individu mutan harapan R65, lebih banyak yang lurus (80%) tapi batangnya pendek-pendek. Karakter warna batang, pada umumnya warna batang individu planlet kontrol dan mutan harapan R65, R75 adalah hijau, kecuali warna batang dari individu-individu mutan harapan R85, selain hijau teramati juga hijau muda. Karakter bentuk daun yang dominan teramati pada individu-individu kontrol maupun mutan harapan MV1 adalah bentuk *elliptic*, sedangkan individu mutan harapan R75 dan R85 memiliki dua bentuk daun lain yaitu *obovate* untuk individu R75 dan *obcordate* untuk R85. Karakter warna daun pada individu kontrol R0 dan mutan harapan R65 adalah sama hijau tua, individu mutan harapan R75 warna daun yang teramati adalah hijau tua dan hijau muda, sedangkan warna daun individu mutan harapan R85 adalah hijau dan hijau muda.

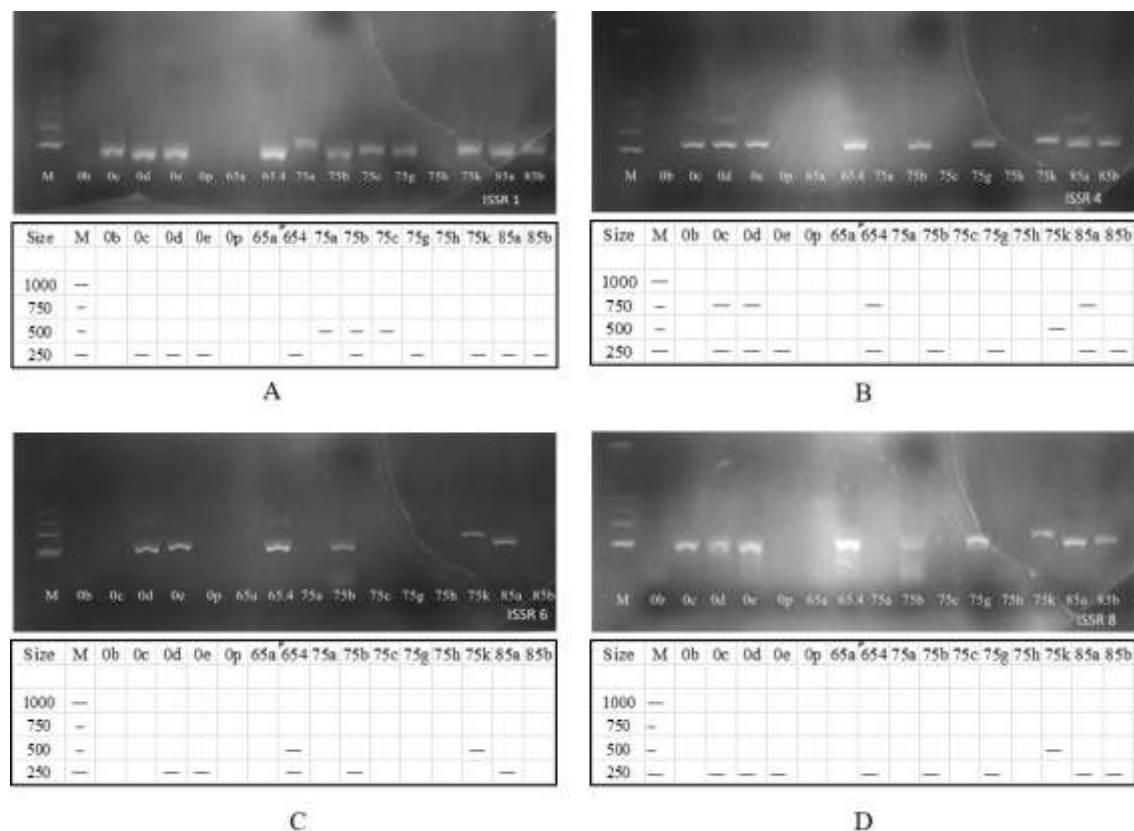
Tabel 2. Karakter kualitatif sifat morfologi planlet calon mutan jeruk keprok SoE hasil iradiasi sinar gamma.

Individu-individu Planlet	Bentuk Batang (%)		Warna Batang	Bentuk Daun	Warna Daun	Tepi Daun	Ketegakan Tunas	Bentuk Stomata
R0	Lurus	20				Rata	Tegak	
	Melengkung	80	Hijau	<i>Elliptic</i> *	Hijau tua	Tidak rata	Tidak tegak	Lonjong
R65	Lurus	80				Rata	Tegak	
	Melengkung	20	Hijau	<i>Elliptic</i> *	Hijau tua	Tidak rata	Tidak tegak	Lonjong
R75	Lurus	40					Tegak	
	Melengkung	60	Hijau	<i>Obovate</i> *	Hijau tua Hijau muda	Tidak rata	Tidak tegak	Lonjong
R85	Lurus	80	Hijau	<i>Elliptic</i> *	Hijau			
	Melengkung	20	Hijau muda	<i>Obcordate</i> *	Hijau muda	Tidak rata	Tegak	Lonjong

Keterangan: (*) dominan diamati



Gambar 1. Dendrogram analisis keragaman genetik berdasar morfologi mutan harapan generasi MV1 jeruk keprok SoE.



Gambar 2. Pola pita-pola pita hasil elektroforesis produk PCR 15 individu sampel uji jeruk keprok menggunakan penanda: A) ISSR 1, B) ISSR 4, C) ISSR 6, dan D) ISSR 8. M: 1 kb

Sifat warna daun individu mutan harapan R75 memiliki warna daun yang sama pada individu kontrol R0, mutan harapan R65 dan R85 yaitu hijau tua dan hijau muda, warna asli dan warna baru mutan harapan. Karakter bentuk tepi daun, untuk individu kontrol R0

teramati rata dan tidak rata, sama dengan individu mutan harapan R65, sedangkan individu mutan harapan R75 dan R85 sama diamati bentuk tepi daun yang tidak rata. Untuk karakter ketegakan tunas, individu kontrol R0, mutan harapan R65 dan R75

adalah sama, diamati ada yang tegak dan tidak tegak. Individu mutan harapan R85 kondisi batang semua tegak. Untuk karakter bentuk stomata, semua individu kontrol R0 maupun mutan harapan R65, R75, dan R85 adalah sama-sama lonjong.

Evaluasi Keragaman Genetik Berdasar Marka ISSR Putatif Mutan Jeruk Keprok SoE

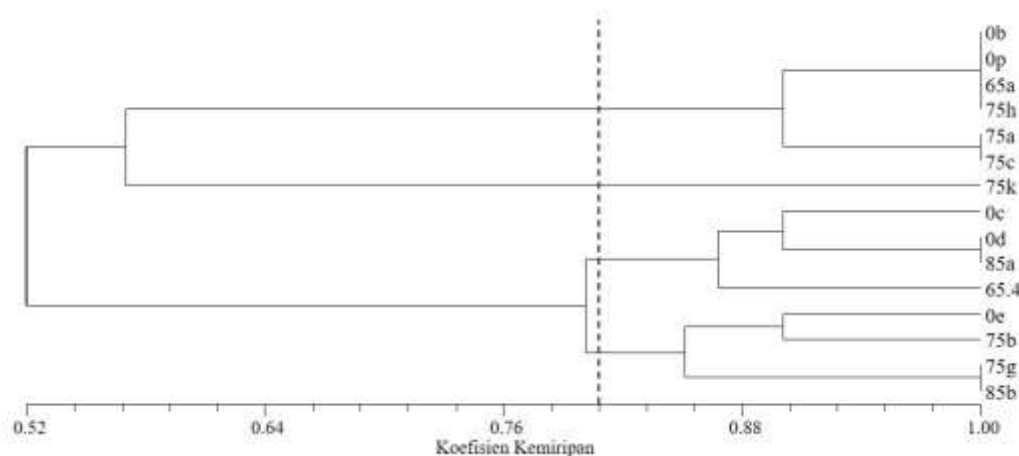
Pola pita-pola pita yang diperoleh dari hasil elektroforesis 15 sampel produk PCR setelah diskoring dan dianalisis dengan menggunakan Software NTSys menghasilkan pola pita yang beragam (polimorfik) (Gambar 2). Pola pita-pola pita yang berbeda tersebut menunjukkan perbedaan susunan genetik dari setiap sampel uji. Hasil pengolahan skoring pola pita dengan Software NTSys berupa dendrogram Gambar 3.

Berdasarkan dendrogram pada Gambar 3 koefisien (tingkat) kemiripan sampel-sampel yang diuji adalah 52-100%, dengan jarak genetik 0-48%. Pada tingkat kemiripan 80% terbentuk 4 kelompok individu sampel uji dengan tingkat kemiripan yang sama. Individu-individu mutan harapan 75a, 75c 90% mirip dengan individu-individu 0b, 0p dan mutan harapan 75h, dan 50% mirip dengan individu 75k, sehingga 75k dapat dikelompokkan sendiri karena memiliki jarak genetik yang lebih besar. Pada grup 3, individu 0c 90% mirip dengan 0d dan 85a. Dua grup

kecil tersebut 87% mirip dengan individu 65.4. Pada grup 4, individu 0e 90% mirip dengan individu mutan harapan 75b, dan keduanya mirip 85% dengan individu-individu mutan harapan 75g dan 85b.

Individu-individu sampel kontrol 0b-0p, 0c-0d, dan 0e berdasarkan dendrogram Gambar 3 berada pada grup-grup yang berbeda menunjukkan bahwa individu-individu tersebut telah berbeda secara genetik. Hal tersebut dapat terjadi akibat pengaruh dari mutasi titik (*point mutation*) ataupun mutasi diam (*silent mutation*). Mutasi titik ataupun mutasi diam hanya mengubah satu pasangan basa nukleotida tanpa menyebabkan perubahan atau penggantian jenis asam amino yang dihasilkan atau dikodekan dari posisi tiga kodon (Sastrosumarjo *et al.*, 2006). Kedua jenis mutasi tersebut dapat dideteksi secara genetik tapi secara fenotipik yang teramati pada sifat morfologi karakter kualitatif adalah sama.

Perubahan-perubahan susunan yang terjadi pada individu-individu sampel kontrol R0 yang terdeteksi secara molekuler dapat disebabkan oleh faktor-faktor yang berasal proses kultur *in vitro*. Faktor-faktor yang dapat menyebabkan terjadinya keragaman somaklonal dalam proses kultur *in vitro* tersebut, seperti: penambahan zat pengatur tumbuh dari golongan auksin dan sitokinin, frekuensi sub kultur, dan periode (lama) kultur (Yulianti *et al.*, 2012).



Gambar 3. Dendrogram analisis keragaman genetik dari sampel kontrol (0b, 0c, 0d, 0e, 0p), sampel mutan harapan generasi MV1 jeruk keprok SoE (65a, 65.4, 75a, 75b, 75c, 75g, 75h, 75k, 85a, dan 85b) berdasar marka ISSR 1, 4, 6 dan 8.

KESIMPULAN

Keragaman genetik yang terjadi pada tanaman jeruk keprok SoE yang disebabkan oleh iradiasi gamma dapat dideteksi baik secara morfologi maupun dengan marka molekuler ISSR. Analisis keragaman genetik berdasarkan morfologi dan marka molekuler ISSR 1, 4, 6 dan 8 memperlihatkan telah terjadinya perbedaan susunan genetik antar individu sampel R75 dan R85 mutan harapan generasi MV1 hasil iradiasi pada dosis iradiasi 75 dan 85 Gray pada bahan awal. Perbedaan genetik yang terjadi pada individu sampel kontrol R0 dan mutan harapan generasi MV1 R65 yang terdeteksi secara molekuler berbeda, tapi secara morfologi tidak berbeda, diduga karena terjadinya proses *diplontic selection* ataupun mutasi diam (*silent mutation*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi (Kemenristekdikti) dan Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat (LPPM) Universitas Negeri Gorontalo (UNG) atas dana Hibah Penelitian Disertasi Doktor (PDD), staf di Lembaga Penelitian (Lemlit) Universitas Negeri Gorontalo (UNG), Ketua dan Sekretaris Lembaga Penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Agisimanto, D., C. Martasari, A. Supriyanto. 2007. Perbedaan primer RAPD dan ISSR dalam identifikasi hubungan kekerabatan genetik jeruk Siam (*Citrus suhuniensis* L. Tan) Indonesia. J. Hort. 17(2): 101-110.
- Ardiana, D.W. 2009. Teknik isolasi DNA genom tanaman pepaya dan jeruk dengan menggunakan modifikasi bufer CTAB. Bul. Tek Pert. 14(1): 12-16.
- Azrai, M. 2005. Pemanfaatan marka molekuler dalam proses seleksi pemuliaan tanaman. J. AgroBiogen. 1: 26-37.
- Bustaman, M. Mahrup. 2003. Panduan Pengoperasian Program Numerical Taxonomy System (NTSYS-pc) Versi 1.8 dan WinBoot untuk Analisis Klaster. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Bogor.
- Guo, H.B., K.Y. Huang, T.S. Zhou, Q.H. Wu, Y.J. Zhang, Z.S. Lang. 2009. DNA isolation, optimization of ISSR-PCR system and primers screening of *Scutellaria baicalensis*. J. Med. Plant. Res. 3: 898-901.
- [IAEA] International Atomic Energy Agency. 1991. Induced Mutations and In Vitro Culture Techniques for Improving Crop Plant Resistance to Diseases. Grunbach Germany.
- Karyanti. 2013. Induksi keragaman kalus embriogenik untuk mendapatkan mutan putatif jeruk Keprok, Garut (*Citrus reticulata* L.) melalui iradiasi sinar gamma. [Tesis]. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Karyanti, A. Purwito, A. Husni. 2015. Radiosensitivitas dan seleksi mutan putatif jeruk keprok Garut (*Citrus reticulata* L.) berdasarkan penanda morfologi. J. Agron. Indonesia. 43(2): 126-132.
- Kepiro, J.L., M.L. Roose. 2007. Nucellar embryony. In I.A. Khan (Ed). Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology. (Ed). London: CAB International.
- Khan, I.A., W.J. Kender. 2007. Citrus, Genetics, Breeding and Biotechnology. CAB International. London.
- Koltunow, A.M., K. Soltys, N. Nito, S. McClure. 1995. Anther, ovule, seed, and nucellar embryo development in *Citrus sinensis* cv. Valencia. Can. J. Bot. 73: 1567-1582.
- Kumar, P. 2009. Potential of molecular marker in plant biotechnology. Plant Omics J. 2: 141-162.
- Mba, C., R. Afza, J. Jankowicz-Cieslak, S. Bado, M. Matijevic, O. Huynh, B.J. Till. 2009. Enhancing genetic diversity

- through induced mutagenesis in vegetatively propagated plants. In Q.Y. Shu (Ed). Induced Plant Mutations in Genomics Era. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Mulyono. 2011. Pengantar Laboratorium Mikroteknik: Teknik Pembuatan Preparat Segar Stomata. Departemen Agronomi dan Hortikultura, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Muthmainnah, H., R. Poerwanto, D. Efendi. 2014. Perubahan warna kulit buah tiga varietas jeruk keprok dengan perlakuan *degreening* dan suhu penyimpanan. J. Hort. Indonesia. 5(1): 10-20.
- Pardal, S.J. 2014. Teknik Mutasi untuk Pemuliaan Tanaman. In Artikel Litbang Pertanian. Jakarta: BB. Biogen.
- Sanjay, L.S., K.N. Mistry, S.D. Shah, R. Thaker, P.B. Vaidya. 2011. Genetic diversity assessment in nine cultivars of *Catharanthus roseus* from Central Gujarat (India) through RAPD, ISSR, and SSR markers. J. Res. Biol. 8: 667-675.
- Sastrosumarjo, S., Yudiwanti, S.I. Aisyah, S. Sujiprihati, M. Syukur, R. Yulianti. 2006. Sitogenetika Tanaman. Bagian Genetika dan Pemuliaan Tanaman. Departemen Agronomi dan Hortikultura. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Setiono, A. Supriyanto. 2005. Poliembrional dan seleksi semai vegetatif pada pembibitan jeruk. Citrusindo, Citrus Indonesia. Vol. 3.05.
- Yulianti, F., N.F. Devy, S. Widyaningsih. 2012. Evaluasi variasi somaklonal pada benih jeruk hasil perbanyakan melalui embriogenesis somatik. J. Hort. 22(3): 210-216.
- Yulianti, F., C. Martasari, Karsinah, T. Hartanto. 2010. Variasi genetik jeruk Keprok SoE (*Citrus reticulata* Blanco) hasil radiasi sinar gamma menggunakan penanda ISSR. Buletin Plasma Nutfah. 16(2): 134-139.